

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kristýna Vacková**

Diferenciační potenciál lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných ze zubní dřeně

Differentiation potential of human dental pulp mesenchymal stem cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Voltrová

Praha, 2019

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Barboře Voltrové za pomoc a cenné rady při zpracování bakalářské práce a za doporučení studijního materiálu.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08.01.2019

.....  
Kristýna Vacková

## Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (dpMSC) jsou díky jejich širokému diferenciacímu potenciálu a jednoduchosti izolace v dnešní době velmi oblíbeným typem kmenových buněk pro studium buněčné terapie a regenerativní medicíny. Získávají se z rutinně odstraněných lidských třetích molárů, které by skončily bez užitku v odpadu, a navíc jejich použití není zatíženo etickými problémy. DpMSC splňují všechna kritéria pro mezenchymální kmenové buňky, relativně dobře se množí v laboratorních podmínkách a vykazují dlouhou *in vitro* životnost. Kromě diferenciaci do osteogenní, adipogenní a chondrogenní linie jsou dpMSC schopné diferenciovat do neurogenní, myogenní a hepatogenní linie, do melanocytů a endotelových buněk. DpMSC se používají především na zvířecím modelu pro *in vivo* regeneraci zubní, kostní, svalové, nervové a jaterní tkáně. Probíhá i několik klinických studií, které zkoumají regenerativní potenciál dpMSC u lidí. Mohou se využívat nejen ve stomatologii pro regeneraci zubní nebo kostní tkáně, ale díky svému původu z neurální lišty je lze využít i pro léčbu neurogenních onemocnění a pro řadu dalších aplikací. Cílem této práce bylo sepsání literární rešerše zaměřené na studium diferenciacího potenciálu lidských dpMSC a na terapeutický potenciál těchto buněk v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství.

**Klíčová slova:** zubní dřeň, mezenchymální kmenové buňky, dpMSC, diferenciaci

## Abstract

Nowadays, dental pulp mesenchymal stem cells (dpMSC) are very popular amongst stem cells used for the study of cell therapy and regenerative medicine, due to their broad differentiation potential and simplicity of isolation. They are isolated from third molars which are often removed during routine surgeries in dentistry and would otherwise be discarded without any benefit as a waste material. Moreover, there are no ethical problems connected with their use. DpMSC fulfil all criteria established for mesenchymal stem cells, proliferate sufficiently and have a long lifespan *in vitro*. Besides their ability to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineage, dpMSC are capable to differentiate into neurogenic, myogenic and hepatogenic lineage and into melanocytes and endothelial cells. Especially, dpMSC are used on animal model organisms for *in vivo* regeneration of tooth, bone, muscle, neuronal and liver tissue. Currently, several clinical trials are investigating the regenerative potential of dpMSC in humans. Apart from application in stomatology for tooth or bone regeneration, they can also be used for the treatment of the neurogenic diseases and for many other applications, on account of their origin in neural crest. The aim of this work was to write a literature review focused on differentiation potential of human dpMSC and their therapeutic potential in regenerative medicine and tissue engineering.

**Key words:** dental pulp, mesenchymal stem cells, dpMSC, differentiation

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Typy kmenových buněk izolovaných ze zubní dřeně .....	3
2.1	Mezenchymální kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (dpMSC).....	3
2.2	Kmenové buňky zubní dřeně mléčných zubů (SHED).....	3
2.3	Pluripotentní kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (DPPSC) .....	4
2.4	Mobilizované kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (MDPSC) .....	4
2.5	Kmenové buňky izolované ze zubní dřeně novorozence (NDPSC).....	5
2.6	Kmenové buňky izolované z nadpočetných zubů (SNTSC) .....	5
3	Izolace a kultivace dpMSC.....	5
4	Diferenční potenciál dpMSC .....	6
4.1	Osteogenní, odontogenní diferenciace .....	6
4.1.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	6
4.1.2	<i>In vivo</i> studie.....	7
4.2	Chondrogenní diferenciace.....	10
4.2.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	10
4.2.2	<i>In vivo</i> studie.....	11
4.3	Adipogenní diferenciace.....	11
4.3.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	11
4.4	Neurogenní diferenciace.....	12
4.4.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	12
4.4.2	<i>In vivo</i> studie.....	13
4.5	Myogenní diferenciace .....	15
4.5.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	15
4.5.2	<i>In vivo</i> studie.....	15
4.6	Diferenciace do endotelových buněk .....	16
4.6.1	<i>In vitro</i> diferenciace.....	16
4.6.2	<i>In vivo</i> studie.....	16
4.7	Hepatogenní diferenciace .....	16

4.8	Diferenciace do melanocytů .....	16
5	Použití dpMSC v klinických studiích.....	16
6	Výhledy do budoucna.....	17
7	Závěr.....	18
8	Seznam použité literatury .....	19

## Seznam použitých zkratk

ALP – alkaline phosphatase, alkalická fosfatáza

aP2 – adipocyte protein 2, adipocytární protein 2

BDNF – brain-derived neurotrophic factor, mozkový neurotrofický faktor

bFGF – basic fibroblast growth factor, bazický fibroblastový růstový faktor

BMP – bone morphogenic protein, kostní morfogenetický protein

BMSC – bone marrow stem cells, kmenové buňky z kostní dřeně

cAMP – cyclic adenosin monophosphate, cyklický adenosinmonofosfát

CD – cluster of differentiation, diferenciační skupina

c-Kit – tyrosin-protein kinase Kit, tyrosinkinázový receptor

CXCR4 – chemokine receptor type 4, chemokinový receptor typu 4

Dlx-5 – distal-less homeobox 5

DMP 1 – dentine matrix protein 1, protein dentinové matrice 1

dpMSC – dental pulp mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky izolované ze zubní dřeně

DPPSC – dental pulp pluripotent stem cells, pluripotentní kmenové buňky izolované ze zubní dřeně

DSP – dentin sialoprotein, dentinový sialoprotein

DSPP – dentin sialophosphoprotein, dentinový sialofosfoprotein

EAAC1 – excitatory amino acid carrier 1, nosič excitačních aminokyselin

EGF – epidermal growth factor, epidermální růstový faktor

ESC – embryonal stem cells, embryonální kmenové buňky

FBS – fetal bovine serum, fetální bovinní sérum

Flk1 – foetal liver kinase-1, fetální jaterní kináza-1

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie granulocytů

G-CSFR – G-CSF receptor, receptor G-CSF

GDNF – glial cell line derived neurotrophic factor, neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie

GFAP – glial fibrillary acidic protein, gliální fibrilární acidický protein

Gro $\alpha$  – growth-regulated oncogene  $\alpha$ , růst regulující onkogen  $\alpha$

HGF – hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor

HLA-DR – human leukocyte antigen – DR isotype, lidský leukocytární antigen – izotop DR

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells, lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly

IBMX – isobutyl methaxanthine, isobutyl metaxantin

IFN $\gamma$  – interferon  $\gamma$

IGF-1 – insulin like growth factor, inzulinu podobný růstový faktor

IL – interleukin, interleukin

iPSC – induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky

ITS – insulin-transferrin-selenium, inzulin-transferin-selen

LIF – leukemia inhibitory factor, faktor inhibující leukémii

MART-1 – melanoma-associated antigen recognized by T cells, melanom asociovaný antigen rozpoznávaný T-lymfocyty

MDPSC – mobilized dental pulp stem cell, mobilizované kmenové buňky izolované ze zubní dřevě

MEF2C – myocyte enhancer factor 2C, zesilující faktor myocytů 2C

MHC – myosin heavy chain, myozinový těžký řetězec

MITF – melanocyte inducing transcription factor, melanocyty indukující transkripční faktor

MSC – mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky

MyHC – myoglobin heavy chain, myoglobinový těžký řetězec

MyoD – myogenic differentiation protein, myoblastický diferenciační faktor

NDPSC – natal dental pulp stem cells, kmenové buňky ze zubní dřevě novorozence

NeuN – neuronal nuclear protein, neuronový jaderný protein

NF-M – neurofilament medium polypeptide, neurofilamentový střední polypeptid

NGF – nerve growth factor, nervový růstový faktor

O1 – oligodendrocyte marker, oligodendrotický marker

Oct-4 – octamer-binding transcription factor 4, oktamer vážící transkripční faktor 4

P75NGFR – low-affinity nerve growth factor receptor, receptor nervového růstového faktoru s nízkou afinitou

PDGF – platelet derived growth factor, destičkový růstový faktor



PPAR $\gamma$  – peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem  $\gamma$

Rex1 – Reduced expression protein 1

rhBMP2 – recombinant human bone morphogenic protein 2, rekombinantní lidský morfogenní protein 2

RUNX2 – runt-related transcription factor 2, transkripční faktor příbuzný runt 2

SA- $\beta$ -gal – senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, se senescencí asociovaná  $\beta$ -galaktosidáza

SCI – spinal cord injury, poranění míchy

Scn1A – sodium voltage-gated channel alpha subunit type 1, alfa 1 podjednotka napětově řízeného sodíkového kanálu

SDF1 $\alpha$  – stromal-cell derived factor 1  $\alpha$ , faktor sekretovaný stromálními buňkami

SHED – stem cells from human exfoliated deciduous teeth, kmenové buňky izolované z mléčných zubů

SNTSC – human supernumerary tooth-derived stem cells, kmenové buňky izolované z nadpočetných zubů

Sox2 – sex determining region Y-box 2, sex determinující faktor Y-box 2

SSEA4 – stage-specific embryonic antigen 4, embryonální antigen specifický pro vývojové stadium 4

Stat3 – signal transducer and activator of transcription 3, signální transduktor a aktivátor transkripce 3

TGF $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$ , transformující růstový faktor  $\beta$

Th – T helper cell, pomocný T-lymfocyt

Trp – tyrosinase related protein, protein příbuzný tyrozináze

VE-cadherin – vascular-endothelial-cadherin, vaskulární endoteliální kadherin

VEGF-A – vascular endothelial growth factor A, vaskulární endoteliální růstový faktor A

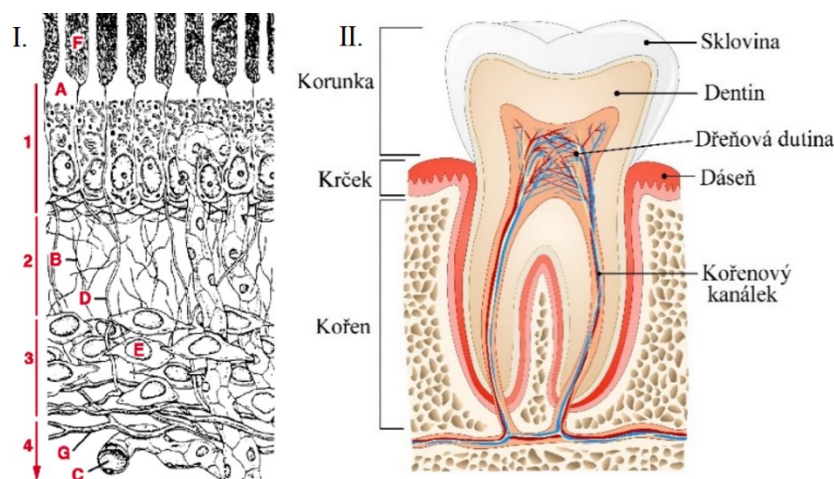
Wnt – wingless related protein, protein příbuzný wingless

# 1 Úvod

Kmenové buňky izolované ze zubní dřevě (z anglického dental pulp mesenchymal stem cells, dpMSC) se řadí mezi takzvané mezenchymální kmenové buňky (MSC), které pocházejí z mezenchymálního zárodečného listu. Tyto buňky jsou multipotentní, to znamená, že mají omezenou schopnost diferenciovat jen do několika buněčných typů. Podle ISCT (International Society for Cellular Therapy, Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii) existuje několik kritérií, které musí MSC splňovat. Patří mezi ně schopnost se za standardních kultivačních podmínek přichytit na plastové povrchy, exprese stromálních povrchových markerů CD73, CD90, CD105 a nepřítomnost nebo nízká exprese hematopoetických markerů CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD79α a HLA-DR, schopnost diferenciovat do osteogenní, adipogenní a chondrogenní linie. MSC patří mezi nejčastěji využívané buňky pro aplikace v regenerativní medicíně (Dominici et al., 2006).

Výzkum lidských dpMSC začal před téměř 20 lety. Tento typ buněk byl poprvé definován Gronthosem a kol. (Gronthos et al., 2000), kteří později ukázali, že dpMSC jsou, za specifických podmínek, schopny diferenciovat do různých typů tkání, například do kostní tkáně, chrupavky, dentinu, tukové tkáně a nervových buněk (Gronthos et al., 2002).

DpMSC se nacházejí v zubní dřevě, která zaujímá prostor v dutině ve středu zubu a pokračuje až do kořenových kanálků. Zubní dřevě se skládá ze čtyř vrstev (viz **Obrázek 1**). Svrchní vrstva, která se nachází hned pod dentinem, je tvořena odontoblasty. Pod ní se nachází takzvaná bezbuněčná vrstva, kam zasahují kapiláry, kolagenová a nervová vlákna. Další vrstva je naopak velmi bohatá na buňky, fibroblasty a nediferenciované mezenchymální buňky. Tato vrstva je zdrojem dpMSC. V poslední vrstvě se nacházejí cévy a nervy (Ferguson, 2002 a Fonzi, 2000, cit. dle Zavan et al., 2011).



**Obrázek 1.**

I. – Schéma umístění buněk v zubní dřevě. 1 – vrstva odontoblastů, 2 – bezbuněčná vrstva, 3 – vrstva bohatá na buňky, 4 – vrstva cév a nervů, A – odontoblasty, B – kolagenová vlákna, C – cévy, D, G – nervy, E – fibroblastové, nediferenciované mezenchymální buňky F – dentin. Převzato z: <http://www.uky.edu/~brmacp/orallhist/module4/lecture/oh4lect.htm>; II. – schéma řezu zubem, upraveno podle: <http://andersondentalgroup.com/index.php?src=blog&srctype=detail&blogid=9>.

DpMSC nejsou jediným typem kmenových buněk, které se dají izolovat ze zubní dřene. Dalšími typy jsou například pluripotentní kmenové buňky izolované ze zubní dřene (DPPSC, dental pulp pluripotent stem cells) (Núñez-Toldrà et al., 2017), mobilizované kmenové buňky izolované ze zubní dřene (MDPSC, mobilized dental pulp stem cells) (Horibe et al., 2014; Iohara et al., 2018; Nakashima et al., 2017), kmenové buňky z dřene mléčných zubů (SHED, stem cells from human exfoliated deciduous teeth) (Miura et al., 2003), kmenové buňky izolované ze zubní dřene novorozenců (NDPSC, natal dental pulp stem cells) (Karaöz et al., 2010) a kmenové buňky izolované z nadpočetných zubů (SNTSC, human supernumerary tooth-derived stem cells) (Huang et al., 2008).

K izolaci dpMSC se většinou využívají resekované, vytržené, nebo problematicky rostoucí třetí moláry, které by skončily nevyužity v odpadu. DpMSC z nich izolované mohou dále posloužit ke zkvalitnění života pacientů. Výhodou mezenchymálních kmenových buněk ze zubní dřene je neinvazivnost odběru a zároveň poměrně jednoduchý způsob izolace oproti ostatním typům MSC (Alkhalil et al., 2015). Nejpoužívanějším typem MSC jsou v současné době kmenové buňky získané z kostní dřene (BMSC). DpMSC mají podobný imunofenotyp a exprimují podobné endoteliální, kostní, fibroblastové a hladkosvalové markery, ale mají vyšší schopnost proliferace *in vitro* než BMSC. DpMSC mají stejně jako BMSC schopnost tvořit depozita vápníku, i když s rozdílnou strukturou (Gronthos et al., 2000). DpMSC mají vyšší schopnost diferenciovat do neurální linie než BMSC, což bylo potvrzeno vyšší expresí povrchových markerů stěžejních pro neurální diferenciaci (Kumar et al., 2017).

Ne vždy dochází k regeneraci poškozené tkáně díky diferenciaci dpMSC do cílových buněk, ale dpMSC mohou napomáhat hojení skrze parakrinní sekreci růstových faktorů, cytokinů a chemokinů (Altanerova et al., 2016).

Kmenové buňky ze zubní dřene mají velký potenciál pro budoucí použití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství díky jejich vysoké proliferační aktivitě a širokému diferenciačnímu potenciálu. Existuje již několik společností, které se zabývají izolací a ukládáním dentálních kmenových buněk různých typů včetně dpMSC a jejich uchováním v buněčných bankách (Hildreth, 2018).

## 2 Typy kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene

### 2.1 Mezenchymální kmenové buňky izolované ze zubní dřene (dpMSC)

Kmenové buňky ze zubní dřene mají typický fibroblastický, podlouhlý, větvenitý tvar s tendencí se přichytávat na plastový povrch. DpMSC se většinou izolují ze třetích stoliček (tzv. „osmiček“). Tato populace dpMSC prokazuje výraznější proliferaci než kmenové buňky z ostatních zubů (Mehrabani et al., 2017). Většinou ve třetí pasáži se provádí charakterizace buněčné populace analýzou povrchových markerů pomocí průtokové cytometrie nebo imunohistochemického barvení. Populace dpMSC obsahuje většinu buněk, které jsou pozitivní na povrchové markery charakteristické pro mezenchymální kmenové buňky, mezi které patří CD73, CD90, CD105, CD44 (Almeida et al., 2018), CD29, CD117 (Hilkens et al., 2013), CD81 (Fujii et al., 2018), CD166 (Kwon et al., 2015) a pouze nepatrné nebo žádné procento buněk, které jsou pozitivní na hematopoietické markery CD34, CD45 a další markery jako CD11b, STRO-1 (Karamzadeh et al., 2012), CD14 (Fujii et al., 2018), HLA-DR (Sakai et al., 2012). Mohou exprimovat i některé pluripotentní markery, které se podílejí na proliferaci kmenových buněk jako Nanog, Oct-4 a Sox2 (Raoof et al., 2014; Ullah et al., 2016). V některých studiích byly z buněk izolovaných ze zubní dřene pomocí průtokové cytometrie a magnetické separace (Yu et al., 2010) selektovány buňky, které vykazovaly pozitivní expresi povrchových markerů CD34, STRO-1 a c-Kit. Takto získaná populace buněk vykazovala značný pluripotentní diferenciační potenciál (Laino et al., 2005; Pisciotta et al., 2015). V jiné práci bylo popsáno, že dpMSC s pozitivní expresí CD34 se liší od buněk CD34 negativních zejména pomalejší proliferací a rychlejším nástupem senescence a následné apoptózy. Tato skutečnost napovídá, že se v zubní pulpě nachází několik různých populací kmenových buněk, které se liší v určitých vlastnostech, a proto velmi záleží na způsobu izolace dpMSC (Pisciotta et al., 2015).

### 2.2 Kmenové buňky zubní dřene mléčných zubů (SHED)

Velmi podobné buňkám dpMSC jsou kmenové buňky, které se izolují z dřene exfoliovaných mléčných zubů. Vzhledem k nepřítomnosti třetích stoliček v dětském chrupu se tyto buňky, na rozdíl od dpMSC, izolují z pulpy řezáků. SHED mají vyšší schopnost proliferace než dpMSC i BMSC. SHED, podobně jako dpMSC, mají potenciál diferenciovat do odontogenní, adipogenní, neurogenní (Miura et al., 2003), osteogenní a chondrogenní linie *in vitro* (Yu et al., 2014). Ve třetí pasáži také vykazují negativní expresi hematopoietických povrchových markerů CD34 a CD45, jsou ale na rozdíl od dpMSC navíc pozitivní i pro markery CD166, STRO-1 a SSEA4 (Yamaza et al., 2010). SHED jsou schopné *in vitro* diferenciovat do hepatocytární linie, proto mají velký potenciál pro regeneraci tkáně po poškození jater, aniž by musela proběhnout transplantace orgánu (Yamaza et al., 2015). Mají také schopnost neoangiogeneze po poranění. Spolu s endoteliálními buňkami z pupečnickové žíly mohou dát vznik novým cévám v poraněné tkáni (Kim et al., 2016).

## 2.3 Pluripotentní kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (DPPSC)

Jedná se o kmenové buňky s pluripotentním potenciálem, jsou tedy schopné diferenciovat do buněk všech tří zárodečných listů. Dalšími typy kmenových buněk s pluripotentním potenciálem jsou embryonální kmenové buňky (ESC) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). Použití těchto buněk je omezeno etickými problémy, které se vyskytují jak při izolaci, tak při následném použití těchto buněk (ESC) a nízkou účinností transfekce (iPSC) (Perez et al., 2016), což neplatí pro DPPSC. Na rozdíl od dpMSC, DPPSC jsou kultivované při nižších buněčných hustotách a v kultivačním mediu, které obsahuje růstové faktory LIF (faktor inhibující leukemii), EGF (epidermální růstový faktor) a PDGF (destičkový růstový faktor). DPPSC vykazují stejně jako dpMSC vysokou expresi CD29 a CD105 a nízkou expresi CD45, navíc exprimují i markery pluripotence (Oct-4, Nanog, Sox2 a SSEA4) (Núñez-Toldrà et al., 2017).

## 2.4 Mobilizované kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (MDPSC)

Mobilizace DPSC spočívá ve schopnosti určité populace buněk (CD105, CXCR-4 a G-CSF pozitivních) migrovat k faktoru stimulujícímu granulocytární kolonie (G-CSF) v podmínkách *in vitro*. Mobilizace probíhá pomocí insertů, které jsou vloženy do kultivačních jamek a které mají místo dna polykarbonátovou membránu propustnou pro buňky. Do těchto insertů se vysejí dpMSC ve třetí pasáži a do spodní misky se přidá kultivační médium s chemoatraktantem G-CSF. Selektovaná populace buněk migruje skrz membránu insertů a následně se uchytí na plast spodní misky, kde buňky dále proliferují. Takto získanou populaci buněk nazýváme MDPSC. Výhodou je, že oproti běžnému získávání specifické buněčné populace není nutné sortovat buňky na průtokovém cytometru (Murakami et al., 2013). U dpMSC dochází s postupujícím věkem dárce v důsledku senescence celého organismu ke ztrátě určitých vlastností buněk. Jedná se zejména o proliferační aktivitu, migraci a anti-apoptický efekt spolu s indukcí trofických faktorů. Naproti tomu MDPSC si zachovávají kmenovost, což dokazuje exprese markerů Oct-3/4, Nanog, Sox2, Rex1, Stat3 a CXCR-4, které jsou typické pro embryonální kmenové buňky. U MDPSC tyto vlastnosti přetrvávají i u starších dárců (44-70 let), a tak nedochází k oslabení terapeutického potenciálu těchto buněk. MDPSC ze starších dárců produkují menší množství markerů senescence SA- $\beta$ -gal, p16, p21, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 a Gro $\alpha$  než dpMSC. I to je známkou toho, že senescence mobilizovaných buněk není tak radikální jako u dpMSC. S procesem senescence je spjata také zkracování telomer. Jak uvádí Horibe a kol., v *in vitro* podmínkách se telomery MDPSC zkracují méně v porovnání s běžnými dpMSC. MDPSC mají také výrazně lepší neurogenní diferenciací potenciál než dpMSC. Tato skutečnost se projevuje mimo jiné v expresi specifických neuronálních markerů (neurofilament, neuromodulin a Scn1A), která je výrazně vyšší než exprese těchto markerů u dpMSC, ať už u buněk z mladších nebo starších dárců. Adipogenní a osteogenní diferenciací potenciál je v obou případech velmi podobný (Horibe et al., 2014).

Bylo prokázáno, že MDPSC jsou bezpečné a účinné při autologní transplantaci buněk za účelem obnovení zubní dřeně po pulpektomii. Nakashima a kol. prezentovali pozitivní výsledky léčby lidských

pacientů, a to pomocí srovnání intenzity signálu z magnetické rezonance zdravé a nově regenerované pulpy po 24 týdnech od transplantace (Nakashima et al., 2017). Iohara a kol. dokázali úspěšnou a bezpečnou allogenní transplantaci MDPSC pro obnovu dřeně po pulpektomii na psím modelu (Iohara et al., 2018).

## 2.5 Kmenové buňky izolované ze zubní dřeně novorozence (NDPSC)

Tyto buňky se izolují ze zubní dřeně nově narozeného dítěte. V porovnání s BMSC mají NDPSC vyšší stupeň proliferace a prokazují výraznější metabolickou aktivitu (Karaöz et al., 2010). Jak popisuje Akpınar a kol., NDPSC vykazují nejvyšší telomerázovou aktivitu, nižší je u SHED a nejnižší u dpMSC (Akpınar et al., 2014). NDPSC jsou schopny diferenciovat mimo linie typické pro multipotentní buňky (osteogenní, chondrogenní, adipogenní) také do inzulin produkujících buněk. V budoucnu by proto mohly najít uplatnění i v léčbě cukrovky, zejména diabetes 1. typu (Suchánek et al., 2017).

## 2.6 Kmenové buňky izolované z nadpočetných zubů (SNTSC)

Jedná se o buňky izolované z nadpočetných zubů (tzv. kolozubů). Tyto buňky exprimují markery kmenových buněk, mají schopnost tvořit kolonie, diferenciovat do adipocytů a osteocytů (Huang et al., 2008). Později bylo zjištěno, že tyto SNTSC mají imunoregulační vlastnosti pro T-buňky *in vitro* a *in vivo* podmínkách (Makino et al., 2013).

# 3 Izolace a kultivace dpMSC

Izolace dpMSC se provádí nejčastěji pomocí enzymatické disociace, kdy se fragmenty zubní dřeně nechají rozštěpit ve směsi enzymů. Nejběžněji se používá směs kolagenázy a dispázy (Ducret et al., 2016; Jung et al., 2016; Qin et al., 2017), nicméně literatura popisuje i jiné enzymy, například liberázu (Ahmed et al., 2016; Horibe et al., 2014; Nakashima et al., 2017) nebo trypsin (Iohara et al., 2004). Získaná suspenze buněk a zbytků disociované tkáně se následně přefiltruje (70-100  $\mu$ m velké otvory ve filtru) a buňky se nasadí do kultivačních lahví nebo misek s vhodným kultivačním médiem. Druhou možností je tzv. explantátová izolace, kdy se tkáň dřeně rozřeže na menší kousky, které se nasadí na kultivační plast, na který buňky z kousků tkáně migrují, adherují a následně proliferují (Spath et al., 2010). Jako nejvýhodnější se ukázala metoda popsaná Raoofem a kol., která je kombinací dvou již zmíněných metod. Kousky zubní dřeně se nechají rozštěpit enzymy jako v první metodě a poté se natrávené kousky umístí na kultivační plast a přikryjí krycím sklíčkem, aby se nevznášely v médiu, a z uchycených kousků odrůstají buňky. Kombinace těchto dvou metod izolace dpMSC poskytuje již po 2 dnech dostatečné množství buněk použitelných pro další pokusy. Získání odpovídajícího počtu buněk po enzymatické disociaci trvá přibližně 4 dny, při kultivaci z kousků dřeně bez použití enzymů dokonce více než 10 dnů (Raoof et al., 2014).

V současné době jsou dpMSC nejčastěji kultivovány v médiu s obsahem FBS (fetální bovinní sérum). Při použití FBS pro kultivaci buněk určených pro lidské terapie hrozí riziko přenosu infekcí

nebo u příjemce může nastat nežádoucí imunitní reakce po transplantaci takto kultivovaných buněk. Proto se v poslední době pro expanzi kmenových buněk používá kultivace bez příměsí komponent zvířecího původu a FBS se nahrazuje například lidským sérem, které funguje jako jeho bezpečnější alternativa (Ferro et al., 2012).

Tkáň zubní dřeně je umístěna uvnitř silné vrstvy dentinu, která je velmi tvrdá a nepropustná pro kyslík. Ten je v kontaktu s buňkami pulpy jen skrze cévy, které vedou kořenem, proto je parciální tlak kyslíku v pulpě menší než v okolním prostředí (Yu et al., 2002). Z tohoto důvodu je výhodnější dpMSC kultivovat v hypoxických podmínkách. Buňky kultivované v hypoxickém prostředí jsou většinou menší a mají větší jádro, dochází u nich ke zlepšení schopnosti proliferace, migrace a zvýšení exprese markerů typických pro kmenové buňky, jako jsou CXCR-4 a G-CSFR a exprese neurotrofických faktorů BDNF (mozkový neurotrofický faktor) a NGF (nervový růstový faktor). Ahmed a kol. popisují, že optimální podíl kyslíku v inkubátoru pro kultivaci dpMSC je 5 % (Ahmed et al., 2016).

## 4 Diferenční potenciál dpMSC

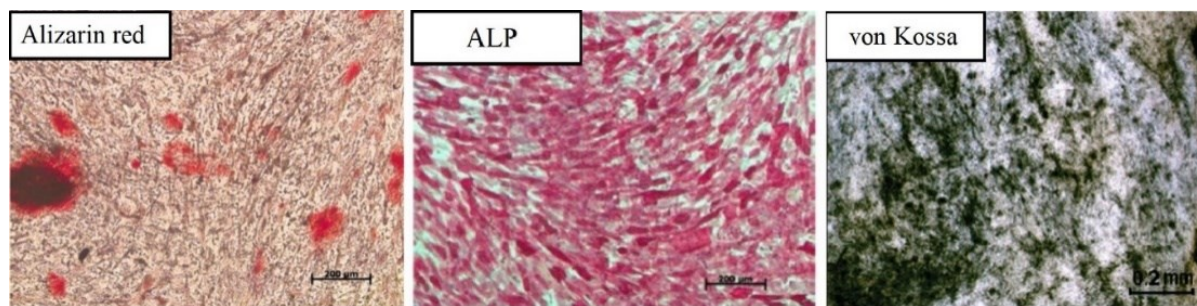
Jak již bylo zmíněno v úvodu, dpMSC jsou schopné diferenciovat do buněk mesenchymální linie (adipocyty, osteocyty, chondrocyty). Schopnost diferenciace závisí na tom, z jak starého dárce kmenové buňky pocházejí. Bylo dokázáno, že dpMSC z dárců ve věku mezi 12–25 lety lépe proliferují a mají vyšší osteogenní a adipogenní diferenční potenciál než dpMSC z dárců ve věku mezi 60–70 lety. Tento jev je následkem senescence, kvůli které se snižuje kvalita buněk i jejich možné použití v regenerativní medicíně (Yi et al., 2017).

### 4.1 Osteogenní, odontogenní diferenciace

#### 4.1.1 *In vitro* diferenciace

Nejčastěji se dpMSC používají k osteogenní či odontogenní diferenciaci. K navození osteogenní i odontogenní diferenciace se do kultivačního média přidávají látky, jako je kyselina askorbová (Alkhalil et al., 2015; Spath et al., 2010), dexamethason a glycerofosfát (Almeida et al. 2018). Pouze pro osteogenní diferenciaci se dále používá například vitamín D3 (Yang et al., 2017), BMP7 (morfogenní protein 7) (Wang et al., 2010) nebo rhBMP2 (rekombinantní lidský morfogenní protein 2) (Kwon et al., 2015). Pro diferenciaci do odontoblastů lze použít dihydrogenfosforečnan draselný a L-glutamin (Karamzadeh et al., 2012). Osteogenní i odontogenní diferenciace se prokazuje barvením buněk pomocí Alizarin Red, alkalické fosfatázy (ALP) (Ajlan et al., 2015) nebo von Kossa barvením (Zhang et al., 2006) (viz **Obrázek 2**). Obarví se depozita vápníku, které jsou viditelné přibližně po dvou týdnech od nasazení buněk do osteogenního média (Karamzadeh et al., 2017). Během jednoho měsíce se pak projeví i morfologické změny, buňky ztrácí svou symetrii a jsou protáhlé. Objevují se i specifické osteogenní a odontogenní povrchové markery, mezi které patří RUNX2, ALP, BMP, kolagen typu I,

osteokalcin, osteonektin, osteopontin, Dlx-5 a DSPP (Ferro et al., 2012) DMP1 (Fatima et al., 2017), Osterix (Pisciotta et al., 2015), BSP, nestin a DSP (Dissanayaka et al., 2015).



**Obrázek 2.**

Barvení dpMSC pro prokázání osteogenní diferenciace. Depozice kalcia barveno pomocí Alizarin Red, měřka 200µm, upraveno podle Ajlan et al., 2015; barvení dpMSC pomocí ALP, měřka 200 µm, upraveno podle Ajlan et al., 2015; barvení dpMSC pomocí von Kossa, měřka 0,2 mm, upraveno podle Zhang et al., 2006.

Pro urychlení regenerace poškozené kostní tkáně je možné použít buněčné nosiče, tzv. skafoldy, které slouží jako podpůrné lešení pro buňky. Buňky se po dobu několika dní či týdnů předem kultivují na skafoldech a následně jsou společně transplantovány do místa poškození. Skafoldy se vyrábí z různých materiálů, jako jsou granulární deproteinizovaná hovězí kost, fosforečnan vápenatý (Annibali et al., 2014; Kraft et al., 2010), kolagen (Chamieh et al., 2016; d'Aquino et al., 2009; Maraldi et al., 2013; Pisciotta et al., 2012), síran vápenatý (Kuo et al., 2015), fosforečnan vápenatý (Li et al., 2016), hydrogel z peptidových nanovláken (Chan et al., 2011), pórovitý keramický skafold (Zhang et al., 2008), Biocoral (přírodní pórovitý hydroxyapatit) (Mangano et al., 2011), pórovitý chitosano-kolagenový skafold (Yang et al., 2011), Puramatrix (peptidový hydrogel) (Cavalcanti et al., 2013) nebo nanovlákná z kyseliny poly L-mléčné (Wang et al., 2011). Při kultivaci dpMSC společně s endoteliálními buňkami z pupečnickové žíly (HUVEC) se zvyšuje míra osteogenní diferenciace, což dokazuje vyšší ALP aktivita a větší míra kalcifikace (Dissanayaka et al., 2012). DpMSC mají velký potenciál v regeneraci kostních tkání, neboť ve srovnání BMSC lépe diferencují do osteogenní linie a jak již bylo zmíněno, jejich izolace je v porovnání s BMSC výrazně jednodušší (Davies et al., 2015).

#### 4.1.2 *In vivo* studie

DpMSC by v budoucnu mohly sloužit v mnoha odvětvích regenerativní medicíny. Nejčastěji se dpMSC používají k obnově zubní dřene, která byla odstraněna v důsledku příliš hlubokého a invazivního zubního kazu, takzvané pulpektomie (Ahmed et al., 2016). Tento problém lze v současné době řešit buď autologní transplantací kmenových buněk pacienta nebo pomocí kovových implantátů. Použití kovových materiálů však může vést k poničení zubu, resorpci tvrdých tkání zubu (Suchánek et al., 2009) nebo ke vzniku zánětu v oblasti implantátu (Peñarrocha et al., 2009; Sussman and Mossf, 1993).



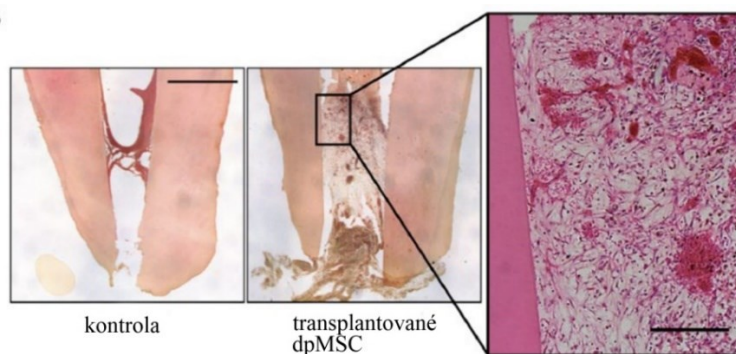
#### 4.1.2.1 Regenerace zubní dřeně

Lidské dpMSC kultivované na kolagenovém skafoldu společně s bFGF (bazický fibroblastický růstový faktor) podpořily regeneraci odontoblastů a cév v pulpě endodonticky léčených lidských zubů implantovaných do hřbetu potkanů (Suzuki et al., 2011).

V další studii byly k regeneraci zubní dřeně použity spolu s dpMSC i HUVEC a skafold Puramatrix. Oba typy buněk byly předem indukované k vaskularizaci *in vitro*. Tato struktura byla vložena do kořenového kanálku zubu a transplantována do imunodeficientních myší. Transplantované buňky uvnitř diferenciovaly do odontoblastické linie. DpMSC v kombinaci s HUVEC vykazovaly lepší vaskularizaci a mineralizaci tkáně než samotné dpMSC. Přesto v této studii byla úspěšná regenerace pouze části tkáně pulpy, kořenový kanálek nebyl zcela zaplněn (Dissanayaka et al., 2015).

V další práci byly pro regeneraci pulpy použity dpMSC v kombinaci se skafoldem z hedvábí a růstovým faktorem SDF1 $\alpha$ , který hraje velkou roli při regeneraci cév. Skafold s dpMSC a SDF1 $\alpha$  byly vloženy do kořenového kanálku tenkého řezu zubu, který byl následně transplantován do myší. SDF1 $\alpha$  umožnil migraci dpMSC pomocí autofágie a napomáhal regeneraci pulpy. Za použití těchto materiálů proběhla regenerace zubní pulpy úspěšně, nová tkáň byla tvořena rovnoměrně rozšířenými buňkami. Uvnitř dřeně byly regenerované cévy a byly patrné známky mineralizace podél stěny kořenového kanálku. Regeneraci ale nezprostředkovaly pouze transplantované buňky, v nově vytvořených cévách byly nalezeny i buňky hostitelské (Yang et al., 2015).

Pro regeneraci zubní pulpy byl dále použit buněčný konstrukt z termoreaktivního hydrogelu s dpMSC namísto skafoldu, který může zapříčinit různé infekce nebo zánět. Navíc se tento konstrukt dá vyrobit v libovolném tvaru a velikosti, což není vždy u skafoldů možné, a proto se ne všechny skafoldy dají použít na některá poranění zubů (určitá hloubka, tvar). Lidský zub s buněčným konstruktem uvnitř kořenového kanálku byl implantován do podkoží imunodeficientních myší. DpMSC po krajích dutiny, v kontaktu s dentinem, diferenciovaly do buněk podobným odontoblastům. Ve středu dutiny transplantované dpMSC diferenciovaly do endoteliálních buněk, které tvořily nové cévy (viz **Obrázek 3**). DpMSC jsou tedy schopné regenerovat tkáň zubní pulpy i bez nutnosti použití skafoldů či růstových faktorů (Itoh et al., 2018).



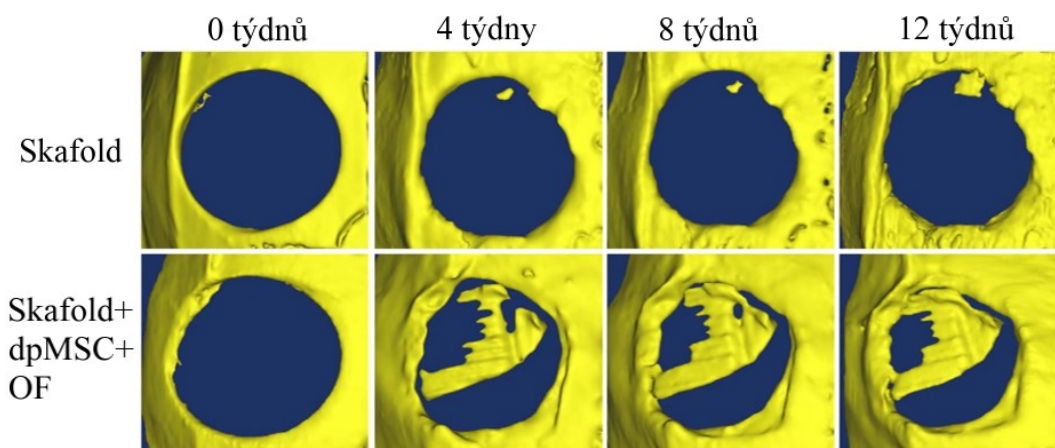
**Obrázek 3.**

Histologické řezy znázorňující regeneraci zubní dřeně pomocí dpMSC a buněčného hydrogelového konstruktu, měřka 1 mm, 200  $\mu$ m ve zvětšené výseči, nabarveno hematoxylin-eosinem, upraveno podle Itoh et al., 2018

#### 4.1.2.2 Regenerace kosti

DpMSC byly úspěšně použity pro regeneraci kostní tkáně spodní čelisti po extrakci spodního třetího moláru u člověka. Buňky byly izolovány z horních třetích molárů těchto pacientů a transplantovány na kolagenovém skafoldu (d'Aquino et al., 2009). O tři roky později byla provedena kontrola úspěšnosti transplantace. Kostní tkáň byla celistvá, nebyla nalezena žádná infekce, všechny funkce spodní čelisti a zubů v okolí regenerované tkáně byly v pořádku (Giuliani et al., 2013).

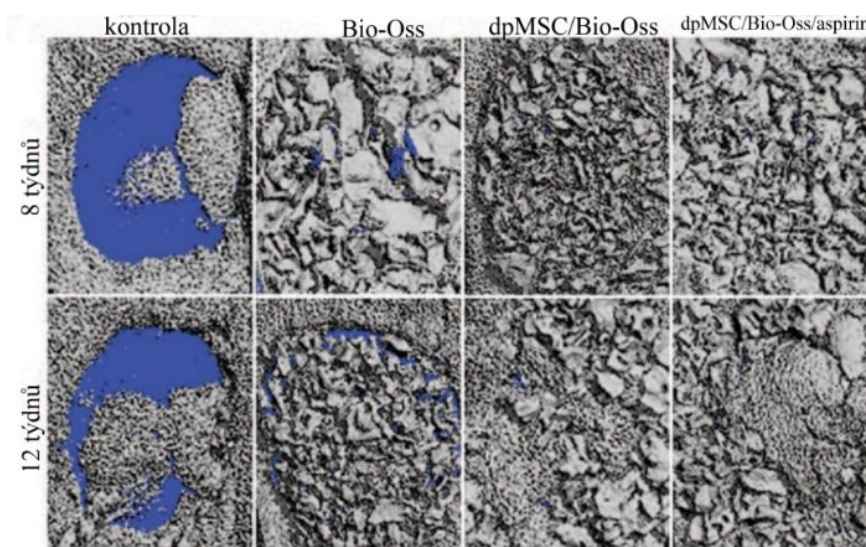
Pro regeneraci poškozené kostní tkáně lebky potkanů byly použity dpMSC společně s osteogenními faktory v kombinaci se skafoldem, který byl navrhnut přesně podle tvaru poranění lebky pomocí počítače. Skafold byl vyroben z biodegradovatelných polyesterů. Pro zjištění účinnosti byl skafold po 0, 4, 8 a 12 týdnech hodnocen (viz **Obrázek 4**). Bylo dokázáno, že po 4 týdnech se začala vytvářet nová kostní tkáň, buňky produkovaly novou mineralizovanou matrix a depozita kolagenu. Následující týdny se nová kostní tkáň stále rozrůstala (Kwon et al., 2015).



**Obrázek 4.**

Porovnání regenerace kostní tkáně v průběhu 0, 4, 8 a 12 týdnů po transplantaci samotného skafoldu nebo skafoldu s dpMSC a osteogenními faktory (OF), upraveno podle Kwon et al., 2015.

V další studii byl zkoumán účinek aspirinu na osteogenní diferenciaci na modelu kraniálního poranění lebky potkanů. Pro regeneraci byla použita anorganická hovězí kost (Bio-Oss) společně s dpMSC a aspirinem. V této kombinaci byla zvýšená exprese osteogenních markerů RUNX, kolagenu typu I a osteokalcinu. Zlepšení bylo viditelné 8. týden po transplantaci a k výraznějšímu zlepšení došlo 12. týden po transplantaci (viz **Obrázek 5**). V poraněné tkáni došlo díky aspirinu k výraznému formování mineralizované tkáně a následnému tvoření nové kosti (Yuan et al., 2018).



**Obrázek 5.**

Průběh regenerace kraniálního poranění pomocí Bio-Oss, Bio-Oss v kombinaci pouze s dpMSC nebo s dpMSC a aspirinem 8 a 12 týdnů po transplantaci, upraveno podle Yuan et al., 2018.

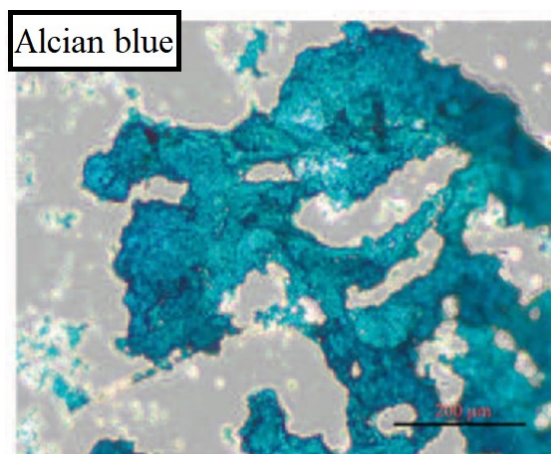
DpMSC byly použity i pro léčbu ztráty kostní tkáně následkem odstranění vaječníků u myši (ovariektomie). Do dpMSC byl vložen gen pro HGF (hepatocytární růstový faktor). Po transplantaci do ocasní žíly dpMSC migrovaly převážně do plic, později i do jater a zřídka do kostní tkáně. Do kostí se dpMSC lépe dostávaly v případě raného stádia následků ovariektomie. Transplantované dpMSC výrazně snížily ztrátu kostní tkáně, což bylo pozorováno na stehenní kosti myši. Autoři předpokládají, že léčba byla důsledkem parakrinního efektu dpMSC, protože vnesené buňky nediferenciovaly do kostních buněk ani se neuchytily v kostní tkáni (Kong et al., 2018).

K regeneraci kostní tkáně mohou být použity i dpMSC izolované ze zubů se zánětem (Li et al., 2016).

## 4.2 Chondrogenní diferenciaci

### 4.2.1 *In vitro* diferenciaci

Chondrogenní diferenciaci se většinou provádí z buněčných pelet, které vznikají centrifugací a následnou kultivací v indukčním médiu přibližně 3 týdny (Yao a Flynn, 2018). Do média se k indukci chondrogenní diferenciaci přidávají látky jako TGF $\beta$ , dexametazon, askorbát-2-fosfát (Spath et al., 2010), pyruvát sodný, prolin, ITS (inzulin, transferin, selen) premix (Karaöz et al., 2010) a kartogenin. Pro chondrogenní diferenciaci také lze použít skafoldy, například chitosan-xantanové (Westin et al., 2017). Chondrogenní diferenciaci se obvykle ověřuje barvením buněk pomocí Alcian blue, která barví sekrety buněk bohaté na mukopolysacharidy typické pro chrupavku (viz **Obrázek 6**) (Yuan et al., 2018). Lze ji prokázat také zvýšenou expresí Sox9, markeru časně chondrogenní diferenciaci a kolagenu typu II, což je naopak marker pro pozdější fázi chondrogenní diferenciaci (Balic et al., 2010).



**Obrázek 6.**

Barvení depozit vápníku dpMSC pomocí Alcian blue, měřka 200  $\mu\text{m}$ , upraveno podle Yuan et al., 2018.

#### 4.2.2 *In vivo* studie

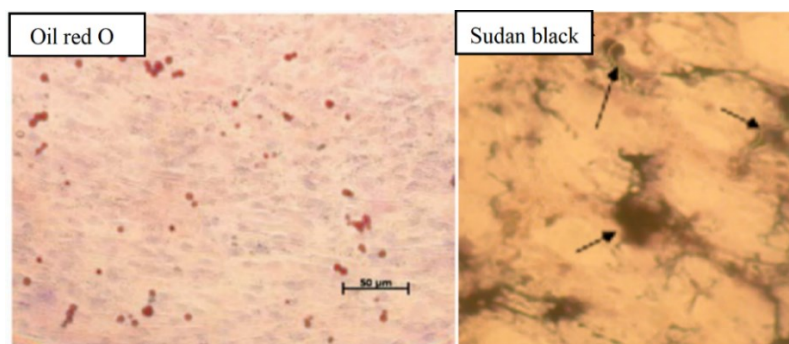
Tvorba trojrozměrného konstruktů pro chondrogenní diferenciaci byla testována ve studii Rizka a Rabieho. Byly selektovány pouze CD146 pozitivní dpMSC a byla indukována diferenciaci pomocí TGF $\beta$ . Takto ošetřené dpMSC byly vloženy do hřbetu myši na skafoldu z kyseliny poly-L-mléčné a polyethylenglykolu. Buňky uvnitř myši exprimovaly lidské TGF $\beta$  a chondrogenní markery kolagen II. typu, Sox9 a agrekan. V okolí implantovaných dpMSC s TGF $\beta$  se tvořila matrix podobná vazivu s glykosaminoglykany (Rizk a Rabie, 2013).

### 4.3 Adipogenní diferenciaci

#### 4.3.1 *In vitro* diferenciaci

K navození adipogenní diferenciaci je potřeba buňky kultivovat v adipogenním médiu, do kterého se přidává dexametazon, inzulin, isobutyl methaxyntin (IBMX) a indometacin (Karaöz et al., 2010). Přibližně po 14 dnech se dá prokázat diferenciaci pomocí barvení buněk Oil red O (Ajlan et al., 2015) nebo Sudan black (Laino et al., 2005), které zviditelní tukové vakuoly (viz **Obrázek 7**). Adipogenní diferenciaci lze prokázat také pomocí pozitivní exprese markerů PPAR $\gamma$  a aP2 (Horibe et al., 2014). Tento typ diferenciaci je ze všech výše uvedených typů u dpMSC nejslabší a projevuje se až v buňkách, které jsou izolované z prořezaných zubů (Balic et al., 2010). Ve studii porovnávající rozdíl v izolaci dpMSC pomocí směsi enzymů kolagenázy a dispázy nebo samotné kolagenázy bylo zjištěno, že dpMSC izolované pomocí kolagenázy samotné mají vyšší schopnost diferenciovat do adipogenní linie než při použití kolagenázy a dispázy zároveň. Vyšší úroveň diferenciaci byla potvrzena vyšší expresí PPAR $\gamma$ 2 a výraznějšími tukovými vakuolami u buněk izolovaných samotnou kolagenázou (Dastgardi et al., 2018). Tento typ diferenciaci se u dpMSC provádí většinou pouze k prokázání splnění kritérií pro MSC.





**Obrázek 7.**

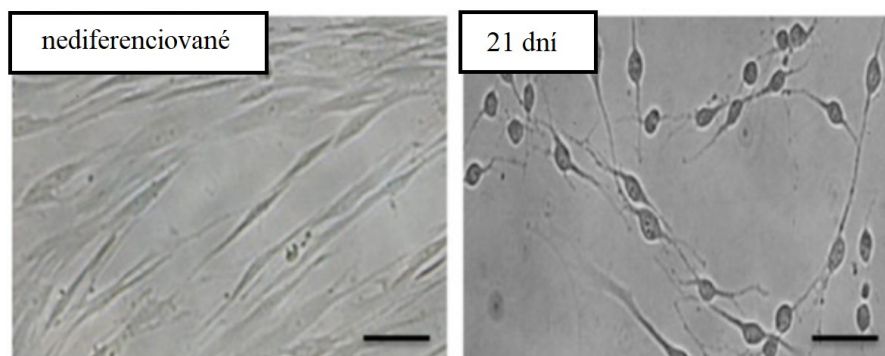
Barvení dpMSC pomocí Oil Red O a Sudan Black na prokázání adipogenní diferenciace, měrka 50 µm, upraveno podle Ajlan et al., 2015; černé šipky ukazují na tukové vakuoly, zvětšení x100, upraveno podle Laino et al., 2005

## 4.4 Neurogenní diferenciace

### 4.4.1 *In vitro* diferenciace

DpMSC mají původ v kraniální neurální liště a díky tomu mají schopnost diferenciovat do neurogenní linie v přítomnosti neurogenního média (Ullah et al., 2017). Neurogenní médium se získává doplněním základního kultivačního média o další látky, jako je například kyselina retinová, cAMP, kyselina askorbová, inzulinu podobný růstový faktor (IGF-1), neurotrofický faktor odvozený z gliální linie (GDNF), sonic hedgehog, BDNF (Chang et al., 2014),  $\beta$ -merkapt ethanol, dimethylsulfoxid, butylhydroxyanisol (Pisciotta et al., 2012), IBMX, epidermální růstový faktor (EGF), bFGF (Karaöz et al., 2010), prasečí heparin (Bressan et al., 2012), chlorid draselný, sodná sůl kyseliny valporové, forskolin, nebo hydroxykortizon (Yang et al., 2017).

Po zahájení diferenciace v neurogenním médiu se zpomalí proliferace buněk a nastává diferenciační proces, při kterém dpMSC exprimují neuronální povrchové markery, typické pro neurony ( $\beta$ III-tubulin), pro astroglální buňky (GFAP), oligodendrocytické buňky (O1) a dále nestin (Chang et al., 2014) a S100 (Bressan et al., 2012). Přibližně po třech týdnech se projeví výrazné morfologické změny buněk v porovnání s nediferenciovanými, zejména výskyt prodlužujících se axonů a větvících se dendritů (viz **Obrázek 8**). Kromě výše zmíněných změn morfologických vlastností byla popsána i pozitivní exprese synaptických markerů synapsinu a synaptofysinu (Ullah et al., 2016).



**Obrázek 8.**

Morfologické změny v průběhu neurogenní diferenciace dpMSC izolovaných ze stoliček mužů ve věku 14-18 let, nediferenciované dpMSC a diferenciované – 21 dní po indukcii neurogenního potenciálu, měrka 100µm. Upraveno podle Ullah et al., 2016.

Diferenciace do neurální linie je navíc podpořena cytokiny, které dpMSC sekretují (zejména G-CSF, IFN $\gamma$  a TGF $\beta$ ). Sekretom dpMSC obsahuje nejvíce těchto látek v porovnání s BMSC, kmenovými buňkami z dentálního folikulu a kmenovými buňkami z apikální papily. Společné působení cytokinů Th1, Th2, Th17, G-CSF, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , neurálních růstových faktorů BDNF a neurotrofinu-3 výrazně zvyšuje neurální diferenciální potenciál dpMSC (Kumar et al., 2017).

#### 4.4.2 *In vivo* studie

##### 4.4.2.1 Poranění míchy

Díky původu dpMSC z neurální lišty lze dpMSC terapeuticky využít pro regeneraci poraněné míchy (SCI). Následkem tohoto poranění bývá ztráta nervových buněk (neuronů, astrocytů, oligodendrocytů). Aplikace lidských dpMSC v subakutní nebo chronické fázi poranění, 7 nebo 28 dní po indukci SCI u myši, měla za následek zlepšení zachování bílé hmoty, vyšší hladinu exprese trofických faktorů v poraněné tkáni, vyšší výskyt axonů a neuronů a zlepšení lokomočních vlastností v porovnání s kontrolami (de Almeida et al., 2011). Přičemž lepších výsledků bylo dosaženo při aplikaci buněk v subakutní fázi než při aplikaci buněk v chronické fázi poranění, kdy již dochází ke ztrátě tkáně a tvorbě astroglálních jizev. Na modelu potkana po SCI bylo dokázáno, že transplantované dpMSC potlačují apoptózu nervových buněk, napomáhají regeneraci poškozených axonů skrze parakrinní sekreci a nahrazují poškozené buňky díky jejich diferenciaci do dospělých oligodendrocytů a neuronů (Yang et al., 2017).

##### 4.4.2.2 Mrtvice

Ve studii Leonga a kol. byly dpMSC použity na potkaním modelu k léčbě indukované fokální cerebrální ischemie, která vzniká jako následek mrtvice. Po intracerebrální transplantaci dpMSC do modelových organismů se výrazně zlepšila funkce senzorického spojení mezi mozkem a poškozenými předními končetinami. Ke zlepšení citlivosti a pohyblivosti předních končetin došlo 4 týdny po transplantaci. DpMSC diferenciovaly nejčastěji do astrocytů, poté do neuronů a vzácně i do oligodendrocytů (Leong et al., 2012).

##### 4.4.2.3 Kortikální léze

Király a kol. použili dpMSC předem diferenciované do neurogenní linie pro regeneraci tkáně potkanů po kortikální lézi. DpMSC byly transplantovány do mozkomíšního moku 3 dny starých jedinců. Po 4 týdnech od aplikace byly dpMSC nalezeny na místě poškození kortexu, kde exprimovaly neuronální (N-tubulin, NF-M, NeuN) a gliální (GFAP) markery. Nicméně mnoho buněk zůstalo pouze v zónách, které obsahují pouze progenitorové buňky. Přibližně 5 % buněk nalezených v kortexu se diferenciovalo natolik, že produkovalo neurotransmitery glutamát dekarboxylázu a EAAC1 (Király et al., 2011).

#### 4.4.2.4 Regenerace periferního nervu

V recentní studii Ullaha a kol. byla provedena úspěšná regenerace periferního nervu u potkanů za pomoci předem diferenciovaných i nediferenciovaných dpMSC. Buňky byly transplantovány do poškozeného sedacího nervu. Po 12 týdnech od transplantace byly provedeny testy zaměřené na schopnost svalové kontrakce pomocí melanocyty indukujícího transkripčního faktoru MITF, při kterých nebyl zřetelný zásadní rozdíl mezi předem diferenciovanými a nediferenciovanými dpMSC. V regenerované tkáni byla nalezena nová myelinizovaná axonová vlákna, která podporovala zacelení porušeného nervu (Ullah et al., 2017).

#### 4.4.2.5 Diferenciace do funkčně aktivního neuronu

Pro regeneraci neuronu byly dpMSC bez předchozí indukce nebo jiných úprav *in vitro* transplantovány do středního mozku dva dny starého kuřecího embrya. Po 24 hodinách od transplantace dpMSC exprimovaly neuronální markery a morfologicky připomínaly bipolární neurony. Později, 48 hodin po transplantaci, byla zřetelná jejich migrace do centrální nervové soustavy a multipolární výběžky (Arthur et al., 2008).

#### 4.4.2.6 Regenerace rohovky

Další možné využití dpMSC v buněčné terapii je při regeneraci tkáně rohovky. Rohovka se za normálních podmínek generuje z takzvaných limbálních kmenových buněk, které se při zranění rohovky velmi jednoduše poškodí. Kushnerev a kol. popisují použití dpMSC přichycené na kontaktních čočkách k aplikaci do tkáně rohovky izolované z lidského oka nevhodného pro transplantaci. DpMSC úspěšně migrovaly do rohovky a transdiferenciovaly do progenitorů epitelu rohovky (Kushnerev et al., 2016). Další studie se zabývala použitím dpMSC na myším modelu slepoty způsobené poškozením rohovky. DpMSC po transplantaci do myší rohovky diferenciovaly do keratocytů, což jsou buňky nacházející se v rohovkovém stroma. Produkovaly lidský kolagen typu I a keratokan. Po pěti týdnech od transplantace byla rohovka transparentní a bez poškození (Syed-Picard et al., 2015).

#### 4.4.2.7 Diabetická neuropatie

Léčba následků diabetu, takzvané diabetické neuropatie, byla taktéž zkoumána pomocí dpMSC. Pokusy byly prováděny na potkanech, u kterých byla indukována neuropatie pomocí streptozotocinu. DpMSC byly 6 týdnů po indukci transplantovány intramuskulárně nebo intravenózně a následně byl sledován rozdíl účinku. Po 2 týdnech od aplikace bylo viditelné zlepšení v teplotní hyperalgézii (zvýšení citlivosti na bolestivý podnět), síle úchopu, pohybové koordinaci a rychlosti nervového vzruchu. Díky dpMSC byl také potlačen zánět, který vznikl následkem neuropatie. U intramuskulární injekce aplikované dvakrát po sobě byly pozorovány nejlepší výsledky a opakované intramuskulární podání bylo vhodné i pro dlouhodobější léčbu neuropatie (Datta et al., 2017).

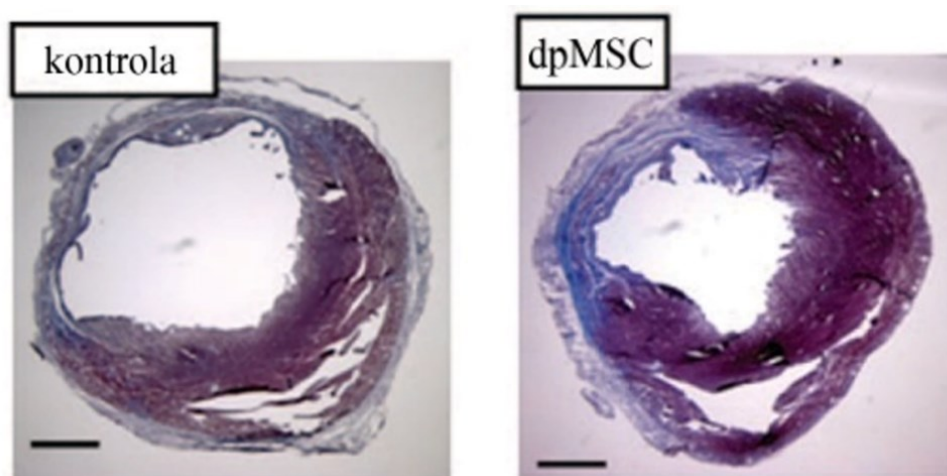
## 4.5 Myogenní diferenciace

### 4.5.1 *In vitro* diferenciace

V několika pracích byl prokázán potenciál dpMSC diferenciovat do myogenní linie. Příkladem je práce Zhanga a kol., kteří použili pro indukci myogenní diferenciace kultivační médium obohacené o dexametazon a hydrokortizon po dobu 3 a 6 týdnů. Až po 6 týdnech byla pozorována změna morfologie a některé buňky připomínaly myoblasty. Pomocí imunohistochemického barvení byla u buněk zjištěna exprese myogenních markerů MyoD1 a MHC. Myogenní diferenciace bohužel nebyla zcela dokončena, jelikož pro myoblasty je typické splnutí do mnohojaderných útvarů (syncytií), které u diferenciovaných dpMSC nebyly pozorovány. Důvodem může být příliš krátká kultivace dpMSC v myogenních podmínkách (Zhang et al., 2006). Myogenní diferenciaci je možné navodit taktéž kultivací dpMSC společně s myšími myoblasty (C2C12). V takovém případě jsou myoblasty viditelné už po 14 dnech (Carnevale et al., 2013). V pozdější studii byl pro myogenní diferenciaci použit dpMSC 5-Aza-2'-deoxycytidin. Zde autoři prezentovali tvorbu myotubul po 24 dnech v podmínkách *in vitro*. Pomocí metody Western blot byl prokázán výrazný nárůst exprese myogenních markerů MEF2C, MyoD, myogenin a MyHC po 24 dnech kultivace buněk (Li et al., 2015).

### 4.5.2 *In vivo* studie

DpMSC byly použity také pro regeneraci myokardu po infarktu na modelu potkana (viz **Obrázek 9**). Ačkoliv bylo dokázáno, že dpMSC nejsou schopné diferenciovat do srdečního a hladkého svalstva, u potkanů 4 týdny po transplantaci nastalo zlepšení funkce srdce, zřejmě díky faktorům umožňujícím regeneraci cév a antiapoptickým faktorům, které dpMSC vylučovaly (Gandia et al., 2008).



**Obrázek 9.**

Regenerace srdeční tkáně, porovnání mezi kontrolou a tkání ošetřenou transplantací dpMSC, měřka 5  $\mu$ m, upraveno podle Gandia et al., 2008.



## 4.6 Diferenciace do endotelových buněk

### 4.6.1 *In vitro* diferenciace

DpMSC mohou diferenciovat *in vitro* do buněk endotelových, které exprimují markery jako jsou CD54, von-Willebrand, CD31 a angiotenzin konvertázy (d'Aquino et al., 2007), Flk 1, VE-cadherin či VEGF-A (Yamamura et al., 2013). Pro diferenciaci do endotelových buněk je nezbytný gen LRP6, který má vliv na expresi endoteliálních markerů a formování kapilár (Silva et al., 2017). DpMSC mohou při kultivaci s HUVEC napomáhat diferenciaci do útvarů podobným cévám v *in vitro* podmínkách. Dokáží prodloužit jejich účinek a udržet jejich stabilitu (Dissanayaka et al., 2012).

### 4.6.2 *In vivo* studie

#### 4.6.2.1 Angiogeneze

Bylo prokázáno, že diferenciace do endoteliální linie je úzce spojena s Wnt/ $\beta$ -catenin kaskádou. Řezy lidského zubu s pulpektomií vyplněné dpMSC a scaffoldem z kyseliny poly L-mlečné byly transplantovány do imunodeficientních myší. Transplantované dpMSC diferenciovaly do buněk cév. Při použití dpMSC s blokovanou Wnt/ $\beta$ -catenin kaskádou vaskulogeneze neproběhla (Zhang et al., 2016).

Myší dpMSC byly použity také pro regeneraci slinných žláz (jejich neovaskularizaci). Předem diferenciované dpMSC do endoteliálních buněk byly společně s Matrigelem, což je sekret buněk z myšího Engelbreth-Holm-Swarm sarkomu, injikovány do podkoží myší. Po 8 týdnech bylo prokázáno výrazné zlepšení schopnosti sekrece slin (Yamamura et al., 2013).

## 4.7 Hepatogenní diferenciace

Mimo výše zmíněné diferenciace se zkoumají diferenciace do dalších linií. Například Kumar a kol. zjistili, že dpMSC jsou schopny diferenciovat do hepatogenní linie. K navození diferenciace přidali do kultivačního média HGF, dexamethazon a ITS premix (Kumar et al., 2017).

## 4.8 Diferenciace do melanocytů

DpMSC mohou také diferenciovat do plně vyvinutých melanocytů. Za použití kultivačního média doplněného o hydrokortizon, inzulin, transferin a bFGF byla diferenciace do melanocytů potvrzena markery MART-1, Trp-1 a Trp-2. Tento typ diferenciace má potenciál při léčbě nemocí způsobených poškozením pigmentových buněk (například vitiligo) bez nutnosti odebrání kožní tkáně k obdržení kmenových buněk schopných diferenciovat do melanocytů (Paino et al., 2010).

## 5 Použití dpMSC v klinických studiích

DpMSC se začínají používat i v humánní medicíně. Existuje několik klinických studií (<https://clinicaltrials.gov>, klíčová slova: dental, pulp, stem cells), které se zabývají využitím různých typů MSC izolovaných z tkáně zubní dřevě k léčbě onemocnění popsaných níže. Většina klinických studií je ve fázi ověřování bezpečnosti a účinnosti těchto buněk na lidský organismus a terapeutické

účinky těchto buněk zatím nejsou známy. V klinické studii NCT02731586 se ověřuje možnost přidavku alogenních dpMSC během aplikace zubních implantátů pro jejich lepší přichycení. Další klinická studie NCT03386877 ověřuje, zda dpMSC spolu s kolagenovým skafoldem zlepší periodontální regeneraci. Bezpečnost a účinnost lokální injekce alogenních dpMSC je testována u chronické periodontální nemoci (NCT02523651). DpMSC jsou testovány pro léčbu diabetu II. typu pomocí intravenózní injekce a při opakovaném podání (NCT03658655). Klinická studie II. fáze (NCT03252535) testuje opakované podání dpMSC (Cellavita HD) pro léčbu Huntingtonovy nemoci. Existuje také studie proveditelnosti přípravy autologního pokročilého léčebného přípravku pro regeneraci dentální pulpy u pacientů s nevratným zánětem pulpy nebo zubními traumaty na bázi zubních kmenových buněk (NCT02842315). Následující studie si dává za cíl vyvinout nový prevaskularizovaný kostní konstrukt využívající dpMSC z extrahovaných zubů moudrosti od pacientů ve věku 13-17 let (NCT03194451).

## 6 Výhledy do budoucna

V budoucnu by mohly být dpMSC běžně používané zubaři a nahradit tak doposud používané syntetické materiály výplní. Jejich využití může být ale daleko širší díky generování iPSC, což spočívá v přeprogramování buněk zpět do embryonální formy, čímž se zvyšuje jejich diferenciační potenciál (Jain a Bansal, 2015).

V terapeutickém odvětví by se dpMSC v budoucnu mohly používat k léčbě mrtvice. Na *in vitro* modelu bylo dokázáno, že jsou schopné projít přes hematoencefalickou bariéru, což by umožňovalo dopravení léčiv přímo do mozku. Je to umožněno sekrecí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A, který zvyšuje propustnost bariéry (Winderlich et al., 2016). Byla prokázána i schopnost dpMSC *in vitro* diferenciovat do  $\beta$ -buněk produkujících inzulin. DpMSC by se výhledově mohly používat i při léčbě diabetes mellitus (Carnevale et al., 2013).

Mohly by být také použity pro regeneraci meziobratlových plotének. Byla zkoumána jejich schopnost migrace na určené místo v kolagenových kapsulích. DpMSC byly dopraveny do meziobratlových plotének a tam zabudovány do buněk původních (Yao a Flynn, 2018).

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat dostupnou literaturu zabývající se diferenciačním potenciálem a možným využitím mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z lidské zubní dřeně v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. Výzkum tohoto typu buněk začal před téměř 20 lety a stále přináší nové poznatky. Zubní dřeň je velmi slibný zdroj mezenchymálních buněk. Zejména díky nenáročné izolaci při rutinních zubařských zákrocích. Literatura popisuje velmi široký diferenciační potenciál dpMSC ať už v podmínkách *in vitro*, či *in vivo*. Mohou diferenciovat do osteogenní, odontogenní, chondrogenní, adipogenní, neurogenní, myogenní, hepatogenní, endoteliální i melanocytární buněčné linie. Diferenciaci do konkrétní buněčné linie zaručuje směs různých látek přidávaných do kultivačního média. Diferenciaci a případnou regeneraci poškozené tkáně lze podpořit pomocí takzvaných skafoldů, což jsou konstrukty ze syntetických či přírodních materiálů, které udržují buňky ve správné pozici a směřují tak jejich diferenciaci či začlenění do tkáně. Regenerace nemusí probíhat pouze díky diferenciaci dpMSC do správné buněčné linie, ale i působením látek, které vylučují do okolního prostředí. DpMSC se často izolují pomocí 3 různých metod, explantátové izolace, enzymatické disociace anebo jejich kombinací. Ze zubní dřeně se mohou izolovat i další typy kmenových buněk než jen dpMSC. Patří mezi ně kmenové buňky izolované z dočasných exfoliovaných zubů, pluripotentní kmenové buňky ze zubní dřeně, mobilizované kmenové buňky ze zubní dřeně, kmenové buňky izolované ze zubní dřeně novorozence a kmenové buňky izolované ze dřeně nadpočetných zubů. Na zvířecích modelech, nejčastěji na myších a potkanech, se již zkoumá jejich účinek pro regeneraci celé řady poranění a onemocnění. Nejčastěji zmiňovanými v současné literatuře jsou ztráta zubní dřeně (pulpektomie), poškození kosti (čelistní, kraniální poranění atd.), poranění míchy. DpMSC je možné použít i na následky mrtvice, kortikální léze, regeneraci periferního nervu, diferenciaci do funkčního neuronu, regeneraci rohovky, regeneraci myokardu po infarktu, angiogenezi. Mimo zvířecí modely již probíhají některé klinické studie s lidskými pacienty nejčastěji s periodontálním onemocněním a také s Huntingtonovou chorobou a diabetes. V budoucnu by se mohly tyto kmenové buňky využívat k lékařským zákrokům (při poškození zubů, kostí, nervů atd.) a nahradit tak doposud používané syntetické materiály, případně zvýšit jejich účinek. DpMSC mají také potenciál v budoucnu léčit nemoci jako je například mrtvice, diabetes, vitiligo, poškození meziobratlové ploténky. DpMSC mají velmi široký diferenciační potenciál, který ještě není zdaleka prozkoumán. V současné době se dpMSC používají ke studii léčby již několika nemocí a regeneraci mnoha typů poškození tkáně a mají slibný léčebný potenciál i pro mnoho dalších onemocnění, který by mohl být realizován v blízké budoucnosti, alespoň na zvířecích modelech. Díky jejich širokému diferenciačnímu potenciálu, jednoduché izolaci a absenci etických problémů mají kmenové buňky ze zubní dřeně velmi slibnou budoucnost jak ve tkáňovém inženýrství, tak v regenerativní medicíně.

## 8 Seznam použité literatury

- Ahmed, N. E.-M. B., Murakami, M., Kaneko, S., and Nakashima, M. (2016) “The Effects of Hypoxia on the Stemness Properties of Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs).” *Scientific Reports* 6 (1).
- Ajlan, S. A., Ashri, N. Y., Aldahmash, A. M., and Alnbaheen, M.S. (2015) “Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells under the Influence of Three Different Materials.” *BMC Oral Health* 15 (1).
- Akpinar, G., Kasap M., Aksoy, A., Duruksu, G., Gacar, G., and Karaoz, E. (2014) “Phenotypic and Proteomic Characteristics of Human Dental Pulp Derived Mesenchymal Stem Cells from a Natal, an Exfoliated Deciduous, and an Impacted Third Molar Tooth.” *Stem Cells International*.
- Alkhalil, M., Smajilagic, A., and Redzic, A. (2015) “Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells Isolation and Osteoblast Differentiation.” *Medicinski Glasnik* 12 (1): 27–32.
- Almeida, F. M., Marques, S. A., Ramalho, B. S., Rodrigues, R. F., Cadilhe, D. V., Furtado, D., Kerkis, I., Pereira, L. V., Rehen, S. K., and Martinez, A. M. B. (2011) “Human Dental Pulp Cells: A New Source of Cell Therapy in a Mouse Model of Compressive Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma* 28 (9): 1939–49.
- Almeida, L. F. D., Babo, P. S., Silva, C. R., Rodrigues, M., Hebling, J., Reis, R. L., and Gomes, M. E. (2018) “Hyaluronic Acid Hydrogels Incorporating Platelet Lysate Enhance Human Pulp Cell Proliferation and Differentiation.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 29.
- Altanerova, U., Benejova, K., Altanerova, V., Tyciakova, S., Rychly, B., Szomolanyi, P., Ciampor, F., Cihova, M., Repiska, V., Ondicova, K., Mravec, B., Altaner, C. (2016) “Dental Pulp Mesenchymal Stem/Stromal Cells Labeled with Iron Sucrose Release Exosomes and Cells Applied Intra-Nasally Migrate to Intracerebral Glioblasma.” *Neoplasma* 63 (6): 925–33.
- Annibali, S., Bellavia, D., Ottolenghi, L., Cicconetti, A., Cristalli, M. P., Quaranta, R., and Pilloni, A. (2014) “Micro-CT and PET Analysis of Bone Regeneration Induced by Biodegradable Scaffolds as Carriers for Dental Pulp Stem Cells in a Rat Model of Calvarial ‘Critical Size’ Defect: Preliminary Data.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 102 (4): 815–25.
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., and Gronthos, S. (2008) “Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues.” *Stem Cells* 26: 1787–95.
- Balic, A., Aguila, H. L., Caimano, M. J., Francone, V. P., and Mina, M. (2010) “Characterization of Stem and Progenitor Cells in the Dental Pulp of Erupted and Unerupted Murine Molars.” *Bone* 46 (6): 1639–51.
- Bressan, E., Ferroni, L., Gardin, C., Pinton, P., Stellini, E., Botticelli, D., Sivoilella, S., and Zavan, B. (2012) “Donor Age-Related Biological Properties of Human Dental Pulp Stem Cells Change in Nanostructured Scaffolds.” *Nanostructured Scaffolds. PLoS ONE* 7 (11): e49146.
- Carnevale, G., Riccio, M., Pisciotta, A., Beretti, F., Maraldi, T., Zavatti, M., Cavallini, G. M., La Sala, G. B., Ferrari, A., and De Pol, A. (2013) “In Vitro Differentiation into Insulin-Producing  $\beta$ -Cells of Stem Cells Isolated from Human Amniotic Fluid and Dental Pulp.” *Digestive and Liver Disease* 45 (8): 669–76.
- Cavalcanti, N. B., Benjamin, D. Z., and Jacques, E. N. (2013) “A Hydrogel Scaffold That Maintains Viability and Supports Differentiation of Dental Pulp Stem Cells.” *Dental Clinics of North America* 29 (1): 97–102.
- Chamieh, F., Collignon, A. M., Coyac, B. R., Lesieur, J., Ribes, S., Sadoine, J., Llorens, A., et al. (2016) “Accelerated Craniofacial Bone Regeneration through Dense Collagen Gel Scaffolds Seeded with Dental Pulp Stem Cells.” *Scientific Reports* 6.
- Chan, B., Wong, R.W.K., and Rabie, B. (2011) “In Vivo Production of Mineralised Tissue Pieces for Clinical Use: A Qualitative Pilot Study Using Human Dental Pulp Cell.” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 40 (6): 612–20.
- Chang, C. C., Chang, K.C., Tsai, S.J., Chang, H. H., and Lin, C. P. (2014) “Neurogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells to Neuron-like Cells in Dopaminergic and Motor Neuronal Inductive Media.” *Journal of the*

d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2007) "Human Postnatal Dental Pulp Cells Co-Differentiate into Osteoblasts and Endotheliocytes: A Pivotal Synergy Leading to Adult Bone Tissue Formation." *Cell Death and Differentiation* 14 (6): 1162–71.

d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., and Papaccio, G. (2009) "Human Mandible Bone Defect Repair by the Grafting of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells and Collagen Sponge Biocomplexes." *European Cells and Materials* 18: 75–83.

Datta, I., Bhadri, N., Shahani, P., Majumdar, D., Sowmithra S., Razdan, R., and Bhonde, R. (2017) "Functional Recovery upon Human Dental Pulp Stem Cell Transplantation in a Diabetic Neuropathy Rat Model." *Cytotherapy* 19 (10): 1208–24.

Davies, O. G., Cooper, P. R., Shelton, R. M., Smith, A. J., and Scheven, B. A. (2015) "A Comparison of the in Vitro Mineralisation and Dentinogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue, Bone Marrow and Dental Pulp." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 33 (4): 371–82.

Dissanayaka, W. L., Hargreaves, K. M., Jin, L., Samaranayake, L. P., and Zhang, C. (2015) "The Interplay of Dental Pulp Stem Cells and Endothelial Cells in an Injectable Peptide Hydrogel on Angiogenesis and Pulp Regeneration *In Vivo*." *Tissue Engineering Part A* 21 (3–4): 550–63.

Dissanayaka, W. L., Zhan, X., Zhang, C., Hargreaves, K. M., Jin, L., and Tong, E. H.Y. (2012) "Coculture of Dental Pulp Stem Cells with Endothelial Cells Enhances Osteo-/Odontogenic and Angiogenic Potential in Vitro." *Journal of Endodontics* 38 (4): 454–63.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwitz, E. M. (2006) "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17.

Ducret, M., Fabre, H., Degoul, O., Atzeni, G., McGuckin, C., Forraz, N., Mallein-Gerin, F., Perrier-Groult, E., Alliot-Licht, B., and Farges, J. Ch. (2016) "Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells in Vivo and Their Evolution upon in Vitro Amplification." *Frontiers in Physiology* 7.

Dastgurdi, M. E., Ejeian, F., Nematollahi, M., Motaghi, A., and Nasr-Esfahani, M. H. (2018) "Comparison of Two Digestion Strategies on Characteristics and Differentiation Potential of Human Dental Pulp Stem Cells." *Archives of Oral Biology* 93: 74–79.

Fatima, N., Khan, A. A., and Vishwakarma, S. K. (2017) "Immunophenotypic and Molecular Analysis of Human Dental Pulp Stem Cells Potential for Neurogenic Differentiation." *Contemporary Clinical Dentistry* 8: 81–89.

Ferguson, D.B. (2002) „Biologia del Cavo Orale. Istologia, Biochimica, Fisiologia“, Casa Editrice Ambrosiana, ISBN 9788840812045

Ferro, F., Spelat, R., d'Aurizio, F., Puppato, E., Pandolfi, M., Beltrami, A. P., Cesselli, D., Falini, G., Beltrami, C.A., and Curcio, F. (2012) "Dental Pulp Stem Cells Differentiation Reveals New Insights in Oct4A Dynamics." *PLoS ONE* 7 (7).

Fonzi, L. (2000) „Anatomia Funzionale e Clinica dello Splancnocranio“, Edi-Ermes, ISBN 887051238-X, Milano

Fujii, Y., awase-Koga, Y., Hojo, H., Yano, F., Sato, M., Chung, U., Ohba, S., and Chikazu, D. (2018) "Bone Regeneration by Human Dental Pulp Stem Cells Using a Helioxanthin Derivative and Cell-Sheet Technology." *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 24.

Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, D. M., Sanchez-Torrijos, J., et al. (2008) "Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction." *Stem Cells* 26 (3): 638–45.

Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., et al. (2013) "Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem

Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications.” *STEM CELLS Translational Medicine* 2 (4): 316–24.

Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Gehron Robey, P., and Shi, S. (2002) “Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.” *Journal of Dental Research* 81 (8): 531–35.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., and Shi, S. (2000) “Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25): 13625–30.

Hildreth C. (2018) „Guide To Dental Stem Cell Companies/Tooth Stem Cells“ [online]. Vydáno 8.11.2018 [cit. 6.1.2019]. Dostupné z: <https://bioinformant.com/dental-stem-cell-companies/>

Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrechts, I., and Bronckaers, A. (2013) “Effect of Isolation Methodology on Stem Cell Properties and Multilineage Differentiation Potential of Human Dental Pulp Stem Cells.” *Cell and Tissue Research* 353 (1): 65–78.

Horibe, H., Murakami, M., Iohara, I., Hayashi, Y., Takeuchi, N., Takei, Y., Kurita, K., and Nakashima, M. (2014) “Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age.” *PLoS ONE* 9 (5).

Huang, A. H.-C., Chen, Y.-K., Lin, L.-M., Shieh, T.-Y., and Chan, A. W.-S. (2008) “Isolation and Characterization of Dental Pulp Stem Cells from a Supernumerary Tooth.” *Journal of Oral Pathology & Medicine* 37 (9): 571–74.

Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakasima, A., and Akamine, A. (2004) “Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2.” *Journal of Dental Research* 83 (8): 590–95.

Iohara, K., Utsunomiya, S., Kohara, S. and Nakashima, M. (2018) “Allogeneic Transplantation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells with the Mismatched Dog Leukocyte Antigen Type Is Safe and Efficacious for Total Pulp Regeneration.” *Stem Cell Research and Therapy*.

Itoh, Y., Sasaki, J. I., Hashimoto, M., Katata, C., Hayashi, M., and Imazato, S. (2018) “Pulp Regeneration by 3-Dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs.” *Journal of Dental Research*.

Jain, A., and Bansal, R. (2015) “Current Overview on Dental Stem Cells Applications in Regenerative Dentistry.” *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 6 (1): 29-34.

Jung, J., Kim, J. W., Moon, H.J., Hong, J. Y., and Hyun, J. K. (2016) “Characterization of Neurogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells Cultured in Xeno/Serum-Free Condition: In Vitro and in Vivo Assessment.” *Stem Cells International*.

Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B. and Sharifi-Zarchi, A. (2017). “Comparative in Vitro Evaluation of Human Dental Pulp and Follicle Stem Cell Commitment.” *Cell Journal* 18 (4): 609–18.

Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., and Aflatoonian, R. (2012) “Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods.” *Journal of Visualized Experiments*, (69), e4372.

Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z. S., et al. (2010) “Isolation and in Vitro Characterisation of Dental Pulp Stem Cells from Natal Teeth.” *Histochemistry and Cell Biology* 133 (1): 95–112.

Kim, J.-H., Kim, G.-H., Kim, J.-K., Pyeon, H. J., Lee, J. C., Lee, G. and Nam, H. (2016). “In Vivo Angiogenic Capacity of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Human Umbilical Vein Endothelial Cells.” *Molecules and Cells* 39 (11): 790–96.

Király, M., Kádár, K., Horváthy, D. B., Nardai, P., Rácz, G. Z., Lacza, Z., Varga, G. and Gerber, G. (2011) “Integration of Neuronally Predifferentiated Human Dental Pulp Stem Cells into Rat Brain in Vivo.” *Neurochemistry International* 59 (3): 371–81.

- Kong, F., Shi, X., Xiao, F., Yang, Y., Zhang, X., Wang, L-S., Wu, C-T., and Wang, H. (2018) "Transplantation of Hepatocyte Growth Factor-Modified Dental Pulp Stem Cells Prevents Bone Loss in the Early Phase of Ovariectomy-Induced Osteoporosis." *Human Gene Therapy* 29 (2): 271–82.
- Kraft, D. C. E., Bindslev, D. A., Melsen, B., Abdallah, B. M., Kassem, M., and Klein-Nulend, J. (2010) "Mechanosensitivity of Dental Pulp Stem Cells Is Related to Their Osteogenic Maturity." *European Journal of Oral Sciences* 118 (1): 29–38.
- Kumar, A., Kumar, V., Rattan, V., Jha, V., and Bhattacharyya, S. (2017) "Secretome Cues Modulate the Neurogenic Potential of Bone Marrow and Dental Stem Cells." *Molecular Neurobiology* 54 (6): 4672–82.
- Kuo, T. F., Lee, S. Y., Wu, H. D., Poma, M., Wu, Y.W., and Yang, J. C. (2015) "An in Vivo Swine Study for Xeno-Grafts of Calcium Sulfate-Based Bone Grafts with Human Dental Pulp Stem Cells (HDPSCs)." *Materials Science and Engineering C* 50: 19–23.
- Kushnerev, E., Shawcross, S. G., Sothirachagan, S., Carley, F., Brahma, A., Yates, J. M., and Hillarby, M. C. (2016) "Regeneration of Corneal Epithelium With Dental Pulp Stem Cells Using a Contact Lens Delivery System." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (13): 5192.
- Kwon, D. Y., Kwon, J. S., Park, S. H., Park, J. H., Jang, S. H., Yin, X. Y., Yun, J. H., et al. (2015) "A Computer-Designed Scaffold for Bone Regeneration within Cranial Defect Using Human Dental Pulp Stem Cells." *Scientific Reports* 5.
- Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. (2005) "A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB)." *J Bone Miner Res* 20: 1394–1402.
- Leong, W. K., Henshall, T. L., Arthur, A., Kremer, K. L., Lewis, M. D., Helps, S. C., Field, J., et al. (2012) "Human Adult Dental Pulp Stem Cells Enhance Poststroke Functional Recovery Through Non-Neural Replacement Mechanisms." *STEM CELLS Translational Medicine* 1 (3): 177–87.
- Li, D., Deng, T., Li, H. and Li, Y. (2015) "MiR-143 and MiR-135 Inhibitors Treatment Induces Skeletal Myogenic Differentiation of Human Adult Dental Pulp Stem Cells." *Archives of Oral Biology* 60 (11): 1613–17.
- Li, Y., Zhao, S., Nan, X., Wei, H., Shi, J., Li, A., and Gou, J. (2016) "Repair of Human Periodontal Bone Defects by Autologous Grafting Stem Cells Derived from Inflammatory Dental Pulp Tissues." *Stem Cell Research and Therapy* 7 (1).
- Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Ma, L., Hoshino, Y., Nonaka, K., Terada, Y., Kukita, T., Shi, S., and Yamaza, T. (2013) "Immune Therapeutic Potential of Stem Cells from Human Supernumerary Teeth." *Journal of Dental Research* 92 (7): 609–15.
- Mangano, C., Paino, F., d'Aquino, R., de Rosa, A., Iezzi, G., Piattelli, A., Laino, L., et al. (2011). "Human Dental Pulp Stem Cells Hook into Biocoral Scaffold Forming an Engineered Biocomplex." *PLoS ONE* 6 (4): e18721.
- Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotto, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., La Sala, G. B., Motta, A., and De Pol, A. (2013) "Human Amniotic Fluid-Derived and Dental Pulp-Derived Stem Cells Seeded into Collagen Scaffold Repair Critical-Size Bone Defects Promoting Vascularization." *Stem Cell Research and Therapy* 4 (3).
- Mehrabani, D., Mahdiyar, P., Torabi, K., Robati, R., Zare, S., Dianatpour, M., and Tamadon, A. (2017) "Growth Kinetics and Characterization of Human Dental Pulp Stem Cells: Comparison between Third Molar and First Premolar Teeth." *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 9 (2): e172–77.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., and Shi, S. (2003) "SHED: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10): 5807–12.
- Murakami, M., Horibe H., Iohara, K., Hayashi, Y., Osako, Y., Takei, Y., Nakata, K., Motoyama, N., Kurita, K., and Nakashima, M. (2013) "The Use of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Induced Mobilization for Isolation of Dental Pulp Stem Cells with High Regenerative Potential." *Biomaterials* 34 (36): 9036–47.
- Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Arijji, Y. and Matsushita, K. (2017) "Pulp Regeneration by Transplantation of Dental Pulp Stem Cells in Pulpitis: A Pilot Clinical Study." *Stem Cell Research*

and Therapy 8 (1).

Núñez-Toldrà, R., Martínez-Sarrà, E., Gil-Recio, C., Carrasco, M. Á., Al Madhoun, A., Sheyla Montori, S. and Maher Atari, M. (2017) “Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells (DPPSC), a New Stem Cell Population with Chromosomal Stability and Osteogenic Capacity for Biomaterials Evaluation.” *BMC Cell Biology* 18 (21).

Paino, F., Ricci, G., De Rosa, A., d’Aquino, R., Laino, L., Pirozzi, G., Tirino, V. and Papaccio, G. (2010) “Ecto-Mesenchymal Stem Cells from Dental Pulp Are Committed to Differentiate into Active Melanocytes.” *European Cells and Materials* 20: 295–305.

Peñarrocha D. M., Boronat-Lopez, A. and García-Mira, B. (2009) “Inflammatory Implant Periapical Lesion: Etiology, Diagnosis, and Treatment-Presentation of 7 Cases.” *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 67 (1): 168–73.

Perez, R.A., Choi, S.-J., Han, C.-M., im, J.-J., Shim, H., Leong, K. W., Kim, H.-W. (2016) „Biomaterials control of pluripotent stem cell fate for regenerative therapy“ *Progress in Materials Science* 82: 234-293

Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., Ferrari, A., Bruzzesi, G. and De Pol, A. (2015) “Human Dental Pulp Stem Cells (HDPSCs): Isolation, Enrichment and Comparative Differentiation of Two Sub-Populations Integrative Control of Development.” *BMC Developmental Biology* 15 (1).

Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., Cavallini, G. M., Ferrari, A., Bruzzesi, G. and de Pol, A. (2012) “Human Serum Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo.” *PLoS ONE* 7 (11): e50542.

Qin, W., Huang, Q.-T., Weir, M. D., Song, Z., Fouad, A. F., Lin, Z.-M., Zhao, L. and Xu, H. H. K. (2017) “Alcohol Inhibits Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells by Activating MTOR Signaling.” *Stem Cells International* 2017.

Raoof, M., Yaghoobi, M. M., Derakhshani, A., Kamal-Abadi, A. M., Ebrahimi B., Abbasnejad, M. and Shokouhinejad, N. (2014). “A Modified Efficient Method for Dental Pulp Stem Cell Isolation.” *Dental Research Journal* 11 (2): 244–50.

Rizk, A. and Rabie, A. B. M. (2013) “Human Dental Pulp Stem Cells Expressing Transforming Growth Factor B3 Transgene for Cartilage-like Tissue Engineering.” *Cytotherapy* 15 (6): 712–25.

Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., R Tauchi, R., et al. (2012) “Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Promote Locomotor Recovery After complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms ” *The Journal of Clinical Investigation* 122 (1): 80–90.

Silva, G. O., Zhang, Z., Cucco, C., Oh, M., Camargo, C. H. and Nör, J. E. (2017) “LRP6 Signaling Is Necessary for Vasculogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells.” *J Endod.* 43 (9).

Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambarà, G., de Angelis, L., Mancini, M., Mitsiadis, T. A., et al. (2010) “Explant-Derived Human Dental Pulp Stem Cells Enhance Differentiation and Proliferation Potentials.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (6 B): 1635–44.

Suchánek, J., Nasry, S. A., and Soukup, T. (2017) “The Differentiation Potential of Human Natal Dental Pulp Stem Cells into Insulin-Producing Cells.” *Folia Biologica (Czech Republic)* 63 (4): 132–38.

Suchánek, Jakub, Tomáš Soukup, Benjamin Visek, Romana Ivancakova, Lenka Kucerova, and Jaroslav Mokry. 2009. “Dental Pulp Stem Cells and Their Characterization.” *Biomedical Papers* 153 (1): 31–35.

Sussman, H. I. and Steven S Mossf, S. S. (1993). “Localized Osteomyelitis Secondary to Endodontic-Implant Pathosis. A Case Report.” *J Periodontol* 64: 306–10.

Suzuki, T., Lee, C. H., Chen, M., Zhao, W., Fu, S. Y., Qi, J. J., Chotkowski, G., Eisig, S. B., Wong, A. and Mao, J. J. (2011) “Induced Migration of Dental Pulp Stem Cells for in Vivo Pulp Regeneration.” *Journal of Dental Research* 90 (8): 1013–18.

Syed-Picard, F. N., Du, Y., Lathrop, K. L., Mann, M. M., Funderburgh, M. L. and Funderburgh, J. L. (2015) “Dental Pulp Stem Cells: A New Cellular Resource for Corneal Stromal Regeneration.” *STEM CELLS*



Ullah, I., Park, J.-M., Kang, Y.-H., Byun, J.-H., Kim, D.-G., Kim, J.-H., Kang, D.-H., Rho, G.-J., and Park, B.-W. (2017). “Transplantation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells or Differentiated Neuronal Cells from Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Identically Enhances Regeneration of the Injured Peripheral Nerve.” *Stem Cells and Development* 26 (17): 1247–57.

Ullah, I., Subbarao, R. B., Kim, E.-J., Bharti, D., Jang, S.-J., Park, J.-S., Shivakumar, S. B., et al. (2016) “In Vitro Comparative Analysis of Human Dental Stem Cells from a Single Donor and Its Neuronal Differentiation Potential Evaluated by Electrophysiology.” *Life Sciences* 154: 39–51.

Wang, J., Liu, X., Jin, X., Ma, H., Hu, J. and Ni, L. (2010) “The Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Nanofibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds in Vitro and in Vivo.” *Acta Biomater* 6: 3856–3863.

Wang, J., Ma, H., Jin, X., Hu, J., Liu, X., Ni, L., and X. Ma, P. X. (2011) “The Effect of Scaffold Architecture on Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells.” *Biomaterials* 32 (31): 7822–30.

Westin, C. B., Trinca, R. B., Zuliani, C., Coimbra, I. B. and Moraes Â. M. (2017) “Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Chondrocytes upon Culture on Porous Chitosan-Xanthan Scaffolds in the Presence of Kartogenin.” *Materials Science and Engineering C* 80: 594–602.

Winderlich, J. N., Kremer, K. L. and Koblar, S. A. (2016) “Adult Human Dental Pulp Stem Cells Promote Blood–brain Barrier Permeability through Vascular Endothelial Growth Factor- $\alpha$  Expression.” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36 (6): 1087–97.

Yamamura, Y., Yamada, H., Sakurai, T., Ide, F., Inoue, H., Muramatsu, T., Mishima, K., Hamada, Y and Saito, I. (2013) “Treatment of Salivary Gland Hypofunction by Transplantation with Dental Pulp Cells.” *Archives of Oral Biology* 58 (8): 935–42.

Yamaza, T., Alatas, F. S., Yuniartha, R., Yamaza, H., Fujiyoshi, J. K., Yanagi, Y., Yoshimaru, K. et al. (2015) “In Vivo Hepatogenic Capacity and Therapeutic Potential of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth in Liver Fibrosis in Mice.” *Stem Cell Research and Therapy* 6 (1): 171.

Yamaza, T., Kentaro, A., Chen, C., Liu, Y., Shi, Y., Gronthos, S., Wang, S. and Shi, S. (2010) “Immunomodulatory Properties of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth.” *Stem Cell Research & Therapy* 1 (1): 5.

Yang, C., Li, X., Sun, L., Guo, W. and Tian, W. (2017) “Potential of Human Dental Stem Cells in Repairing the Complete Transection of Rat Spinal Cord.” *Journal of Neural Engineering* 14 (2).

Yang, J.-W., Zhang, Y.-F., Wan, C.-Y., Sun, Z.-Y., Nie, S., Jian, S.-J., Zhang, L., Song, G.-T. and Chen, Z. (2015) “Autophagy in SDF-1 $\alpha$ -Mediated DPSC Migration and Pulp Regeneration.” *Biomaterials* 44: 11–23.

Yang, X., Han, G., Pang, X. and Fan, M. (2011) “Chitosan/Collagen Scaffold Containing Bone Morphogenetic Protein-7 DNA Supports Dental Pulp Stem Cell Differentiation in Vitro and in Vivo.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*.

Yao, L. and Flynn, N. (2018) “Dental Pulp Stem Cell-Derived Chondrogenic Cells Demonstrate Differential Cell Motility in Type I and Type II Collagen Hydrogels.” *Spine Journal* 18 (6): 1070–80.

Yi, Q., Liu, O., Yan, F., Lin, X., Diao, S., Wang, L., Jin, L., Wang, S., Lu, Y. and Fan, Z. (2017). “Analysis of Senescence-Related Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp Stem Cells.” *Cells Tissues Organs* 203 (1): 1–11.

Yu, C. Y., Boyd, N. M., Cringle, S. J., Alder, V. A., and Yu, D. Y. (2002) “Oxygen Distribution and Consumption in Rat Lower Incisor Pulp.” *Archives of Oral Biology* 47 (7): 529–36.

Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Shi, J., and Jin, Y. (2010) “Differentiation Potential of STRO-1 + Dental Pulp Stem Cells Changes during Cell Passaging.” *Cell Biology* 11: 32.

Yu, S., Diao, S., Wang, J., Ding, G., Yang, D., and Fan, Z. (2014) “Comparative Analysis of Proliferation and Differentiation Potentials of Stem Cells from Inflamed Pulp of Deciduous Teeth and Stem Cells from Exfoliated

Deciduous Teeth.” *BioMed Research International*.

Yuan, M., Zhan, Y., Hu, W., Li, Y., Xie, X., Miao, N., Jin, H., and Zhang, B. (2018) “Aspirin Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells.” *International Journal of Molecular Medicine* 42 (4): 1967–76.

Zavan, B., Bressan, E., Bressan, S., Brunello, G., Gardin, C., Ferrarese, N., Ferroni, L., and Stellini, E. (2011) “Dental Pulp Stem Cells and Tissue Engineering Strategies for Clinical Application on Odontoiatric Field.” *Biomaterials Science and Engineering*, 339–48.

Zhang, W., Walboomers, X.F., van Osch, G. J.V.M., van den Dolder, J., and Jansen, J. A. (2008) “Hard Tissue Formation in a Porous HA/TCP Ceramic Scaffold Loaded with Stromal Cells Derived from Dental Pulp and Bone Marrow.” *Tissue Engineering Part A* 14 (2): 285–94.

Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., and Jansen, J. A. (2006) “Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation.” *Tissue Engineering* 12: 2813–23.

Zhang, Z., Nor, F., Oh, M., Cucco, C., Shi, S., Nör, J. E. (2016) “Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Determines the Vasculogenic Fate of Post-Natal Mesenchymal Stem Cells Graphical Abstract HHS Public Access.” *Stem Cells* 34 (6): 1576–87.